



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년10월10일
(11) 등록번호 10-1189822
(24) 등록일자 2012년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0041103
(22) 출원일자 2010년04월30일
심사청구일자 2010년04월30일
(65) 공개번호 10-2011-0121493
(43) 공개일자 2011년11월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR09504450000 B1

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
이우송
전라북도 정읍시 입신길 181, 한국생명공학연구원
전북분원 생물산업 기술 연구센터 (신정동)
노문철
대전광역시 유성구 엑스포로 501, 청구아파트 10
4동 1605호 (전민동)
(74) 대리인
손민
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 김범수

(54) 발명의 명칭 **쿠마린계 화합물을 포함하는 뉴라미니테이즈 활성의 억제용 조성물 및 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 쿠마린계 화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니테이즈 활성의 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 감초로부터 분리한 쿠마린계 화합물이 뉴라미니테이즈의 활성을 억제하는 효과를 나타내므로 상기 화합물을 포함하는 본 발명에 따른 조성물들은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

박수진

광주광역시 서구 상무1동 모아제일아파트 103동
1701호

류영배

광주광역시 광산구 월계로 59, 호반2차 아파트 21
5동 202호 (월계동)

장종선

전라북도 정읍시 입신길 181, 한국생명공학연구원
전북분원 생물산업 기술 연구센터 (신정동)

권형준

대전광역시 대덕구 계족로505번길 46 (중리동)

정형재

경상남도 진주시 가호로 26, 가좌 주공2차아파트
208동 1204호 (가좌동)

김하현

광주광역시 북구 두암3동 주공아파트 206동 105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 30802520521?C G000

부처명 한국생명공학연구원

연구사업명 기획 (지정공모) 과제

연구과제명 조류인플루엔자 예방용 사료 첨가제 및 식의약 생물 소재 개발

주관기관 농림수산식품기술기획평가원

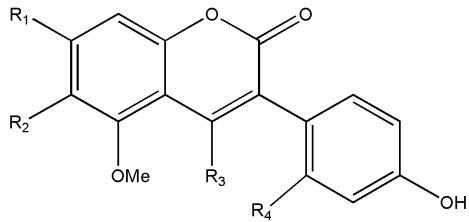
연구기간 2008년 12월 20일 ~ 2013년 12월 19일

특허청구의 범위

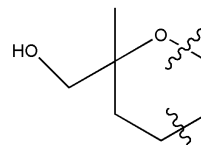
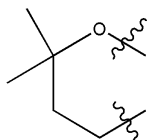
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물:

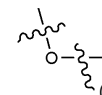
[화학식 1]



상기 화학식 1에서, 각각 독립적으로 R₁은 히드록시 또는 C₁-C₆ 알콕시이고, R₂는 C₂-C₅ 알케닐이거나, 또는 R₁



및 R₂가 함께 (1,1-다이메틸트리메틸렌옥시) 또는 리메틸렌옥시)를 형성하며,



각각 독립적으로 R₃은 수소이고, R₄는 히드록시이거나, 또는 R₃ 및 R₄가 함께

(옥소)를 형성한다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R₁은 메톡시인 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

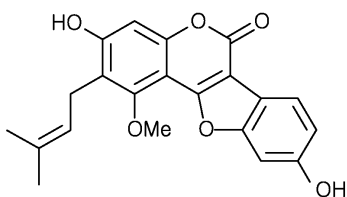
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 R₂는 3-메틸-2-부테닐인 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

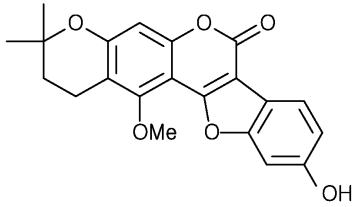
청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물:

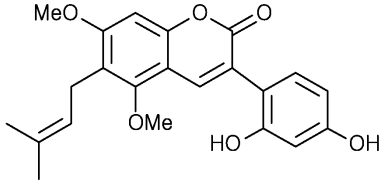
[화학식 2]



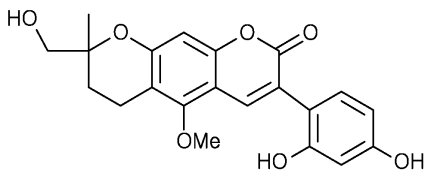
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 감초로부터 분리한 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스 또는 C형 인플루엔자 바이러스인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 또는 폐렴인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 독감은 조류독감, 돼지독감 또는 염소독감인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

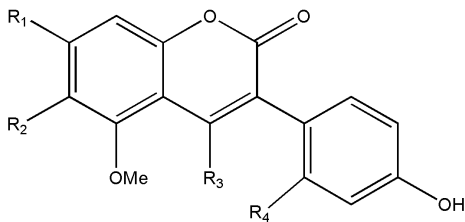
청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

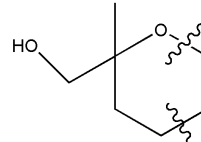
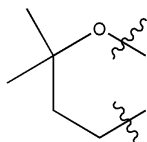
청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



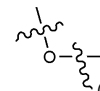
상기 화학식 1에서, 각각 독립적으로 R₁ 은 히드록시 또는 C₁-C₆ 알콕시이고, R₂는 C₂-C₅ 알케닐이거나, 또는 R₁



및 R₂가 함께 (1,1-다이메틸트리메틸렌옥시) 또는 리메틸렌옥시)를 형성하며,

(1-하이드록시메틸-1-메틸트

각각 독립적으로 R₃은 수소이고, R₄는 히드록시이거나, 또는 R₃ 및 R₄가 함께

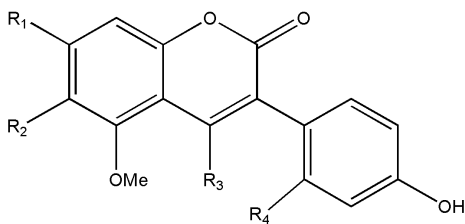


(옥소)를 형성한다.

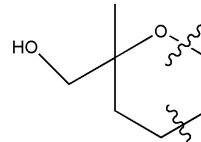
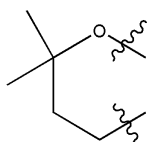
청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선용 의약품 조성물:

[화학식 1]



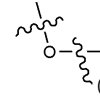
상기 화학식 1에서, 각각 독립적으로 R₁ 은 히드록시 또는 C₁-C₆ 알콕시이고, R₂는 C₂-C₅ 알케닐이거나, 또는 R₁



및 R₂가 함께 (1,1-다이메틸트리메틸렌옥시) 또는

(1-하이드록시메틸-1-메틸트

리메틸렌옥시)를 형성하며,



각각 독립적으로 R₃은 수소이고, R₄는 히드록시이거나, 또는 R₃ 및 R₄가 함께 (옥소)를 형성한다.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 뉴라미니테이즈 활성 억제 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 쿠마린계 화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니테이즈 활성의 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 급성 호흡기 질환을 일으키는 전염성이 매우 강한 바이러스로 온 세계에 집단감염이나 대유행을 야기하여 소아, 고령자, 심폐질환 환자에게 심각한 호흡기 증상을 유발하는 바이러스 중 하나이다 (Hien, T. T. et al. *N. Eng. J. Med.*, 350, 1179, 2004). 인플루엔자 바이러스는 분류학적으로 오르토믹소바이러스(*Orthomyxovirus*)에 속하며 A, B, C의 3가지 형이 있으며 특히 유행적으로 확산되는 형은 A, B형이다. 이들 바이러스 표면에는 당단백질인 적혈구 응집소(hemagglutinin, HA)와 뉴라미니테이즈(neuraminidase, NA)라는 두 종류의 표면 항원이 존재하고 내부에는 8개의 분절되어진 RNA가 존재한다. 헤마글루티닌(hemagglutinin)은 머리와 줄기로 구성되어 있는 트라이머(trimer) 형태이고, 이중 머리 부분은 대부분의 항원 변이와 관련되어 있으며 숙주세포의 표면에 있는 말단 시알산 잔기와 결합하여 바이러스를 부착시키고 순차적으로 바이러스가 숙주세포로 침투할 수 있게 한다(Chandrasekaran, A. et al. *Nature biotechnology* 26, 107, 2008). 뉴라미니테이즈(neuraminidase)는 머리와 줄기형태를 가지는 버섯모양의 테트라머(tetramer)로 머리상단 표면에 활성자리가 있으며 감염된 세포내에서 복제 및 증식된 바이러스가 세포표면의 올리고사카라이드 부분과 말단 뉴라민산(neuraminic acid) 잔기를 연결해주는 알파-케토사이드 본드(ketosidic bond)를 절단하여 바이러스를 숙주세포 밖으로 배출하여 호흡기 점막세포로 침투하는데 중요한 역할을 한다(a. Mark, V. I. *Nature review* 6, 967, 2007. b. Huberman, K. et al. *Virology* 214, 294, 1995).

- [0003] 바이러스의 표면항원들은 동일한 아형에서 변이를 일으키고, 매년 새로운 항원 변이주가 출현한다. 특히, 인플루엔자 바이러스 중 최근까지 문제가 되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스는 대변이가 일어나 닭, 칠면조, 오리 및 야생조류 등 여러 종류의 조류를 감염시키며 빠른 전파로 인해 닭이 감염되면 80% 이상이 폐사하므로 전 세계적으로 양계산업에 가장 큰 피해와 위협을 주는 바이러스 질환이며 그 과급효과는 양계산업에만 한정되어 있지 않고 인체 감염으로 인하여 사람에게도 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Gubareva, L. V. et al. *Lancet*. 355, 2000).
- [0004] 따라서, 바이러스 질병을 치료하기 위한 방법으로 상피세포로의 흡착 저해, 세포로의 침입 저해, 유전자의 전사 및 복제의 저해, 단백질 합성의 저해, 세포로부터 방출의 억제 등을 생각할 수 있으며, 이들 각각은 항 바이러스의 표적이 되고 있다.
- [0005] 종래부터 인플루엔자 바이러스를 치료하기 위해서 아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine), 자나미비르(Zanamivir), 오셀타미비르(Osetamivir) 등 4가지 물질이 미국식품의약품 안전청(FDA)으로부터 승인받아 사용되고 있다. 그러나 바이러스 증식에 필수적인 세포막 단백질인 M2 단백질의 이온채널을 차단하여 바이러스의 탈외피(uncoating)를 방해함으로써 항바이러스 작용을 하는 M2 억제제인 아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine)은 인플루엔자 바이러스 A형에만 효과가 있으며 40년 동안 사용되는 동안 내성을 가진 바이러스가 발생하고 신경계 및 위장에 심각한 부작용이 나타나는 것으로 보고되고 있다(Bantia, S. et al. *Antiviral Research* 69, 39, 2006). 1999년 이후에는 바이러스의 증식에 중요한 역할을 하고 내성 발생 빈도가 낮으며, A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 모두에 안정적으로 존재하는 뉴라미니데이즈의 저해제인 자나미비르(Zanamivir), 오셀타미비르(Osetamivir)와 같은 신약에 의한 바이러스 감염 치료가 보고되고 있다(Zhang, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3009, 2006).
- [0006] 그러나 자나미비르의 경우에는 높은 항바이러스 효과를 가지지만 낮은 생체이용율과 빠른 신장에서의 배출의 단점(Ryan, D. M. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 2583, 1995)을 가지고 있으며, 오셀타미르는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 있다.
- [0007] 현재까지 개발된 항바이러스들은 심한 부작용을 나타내고 있으며 그 응용에 대한 많은 주의가 필요하다. 또한, 백신의 개발은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스가 맞지 않으면 효과가 낮은 문제점이 있기 때문에 감염 억제 효과가 뛰어나고 안정성이 우수한 새로운 인플루엔자 바이러스제의 개발의 필요성이 증가하고 있다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 쿠마린계 화합물이 뉴라미니데이즈에 대한 억제활성을 나타내는바 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료에 이용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

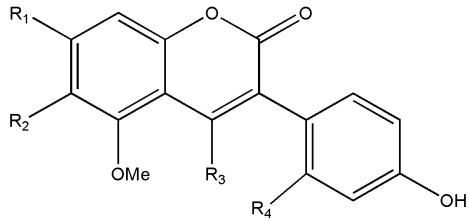
해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 쿠마린계 화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물 및 이를 이용한 치료방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 쿠마린계 화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 쿠마린계 화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선을 위한 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 다양한 생물 종에 존재하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하여 그와 관계되는 질환의 치료에 이용할 수 있는 쿠마린계 화합물을 포함하는 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물 및 이를 이용한 억제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

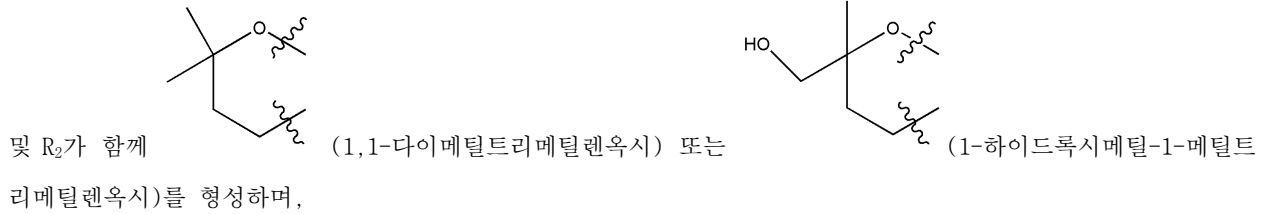
- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 양상으로서, 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.

[0014] [화학식 1]

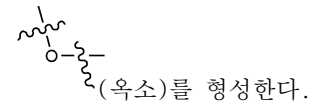


[0015]

[0016] 상기 화학식 1에서, 각각 독립적으로 R₁ 은 히드록시 또는 C₁-C₆ 알콕시이고, R₂는 C₂-C₅ 알케닐이거나, 또는 R₁



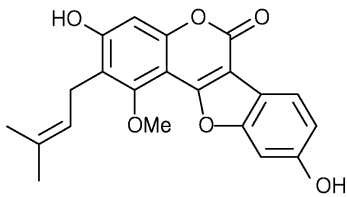
[0017] 각각 독립적으로 R₃은 수소이고, R₄는 히드록시이거나, 또는 R₃ 및 R₄가 함께



[0018] 보다 바람직하게, 상기 R₁은 메톡시이고, 상기 R₂는 3-메틸-2-부테닐이다.

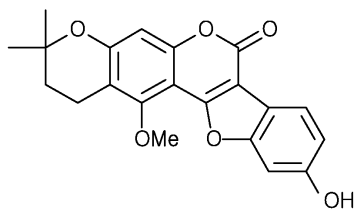
[0019] 가장 바람직하게, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2-5로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0020] [화학식 2]



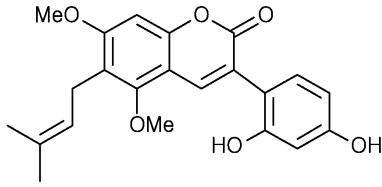
[0021]

[0022] [화학식 3]



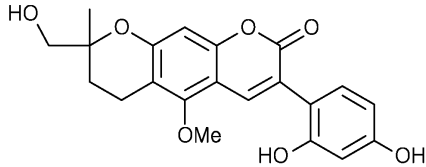
[0023]

[0024] [화학식 4]



[0025]

[0026] [화학식 5]



[0027]

[0028] 본 발명의 또 다른 양상에 따르면, 상기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물을 인플루엔자 바이러스 감염의 발병 또는 발병 가능성이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 치료방법이 제공된다.

[0029] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하면서 바이러스 복제에 필수적인 기능을 하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제함으로써 인플루엔자 바이러스가 호흡기관 내 다른 세포로 확산되는 것을 차단하기 때문에 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0032] 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스일 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스는 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴을 일으킬 수 있으며, 특히 조류독감, 돼지독감 또는 염소독감을 야기시킬 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 감초 등의 식물로부터 추출 분리하여 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 감초로부터 분리하여 사용하는 경우, 상기 화합물을 분리하기 위한 방법은 하기와 같이 수행될 수 있다.

[0035] 먼저, 감초를 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 감초 추출물을 얻는다(단계 1). 상기 추출물에는, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나도 포함하는 것으로 한다. 상기 감초는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 깨끗이 세척하고 건조하여 사용한다. 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급 알코올을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 사용할 수 있다. 추출 방법은 특별히 제한되지 않고, 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할

수 있다.

[0036] 상기 단계 1에 있어서, 상기 감초 추출물을 얻는 단계는 건조된 감초를 음건 세절하여 추출용기에 넣고 적당한 양의 알코올을 첨가하고, 이를 상온에서 10일 동안 방치한 후 거름종이 등으로 여과하여 수행될 수 있다. 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출하며, 이러한 추출 과정은 수회 반복될 수 있으며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법이 추가적으로 수행될 수 있다.

[0037] 이어서, 상기 단계 1에서 얻은 감초 추출물에 물을 가하여 현탁시키고, 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트를 사용하여 순차적으로 분획하여 감초 분획물을 얻는다(단계 2). 이때, 통상의 분별 추출 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 분별 깔데기를 사용할 수 있다. 상기 감초 분획물은 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물로 얻을 수 있다.

[0038] 그 후, 상기 단계 2에서 얻은 감초 분획물을 실리카겔 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1 내지 5 중 어느 하나로 표시되는 쿠마린계 화합물을 얻을 수 있다(단계 3). 상기 화합물 분리를 위한 실리카겔 크로마토그래피를 수행하는 경우, 이동상으로는 *m*-헥산, *n*-헥산 에틸아세테이트, 클로로포름·아세톤 혼합용매 및 메탄올을 사용하는 것이 바람직하고, 추가되는 크로마토그래피에서는 *m*-헥산·아세톤 혼합용매를 사용할 수 있다. 이때 사용되는 *m*-헥산·에틸아세테이트 혼합용매의 부피비는 50:1 ~ 1:5 부피비가 바람직하며, 클로로포름·아세톤 혼합용매일 경우에는 150:1 ~ 1:4 부피비가 바람직하다. 상기 크로마토그래피는 단일 화합물이 정제될 때까지 1회 내지 수회에 걸쳐 수행할 수 있으며, 필요에 따라 농축, 재결정을 실시할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 쿠마린계 화합물들은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0040] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1 또는 5의 유도체를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0041] 동량의 상기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 쿠마린계 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

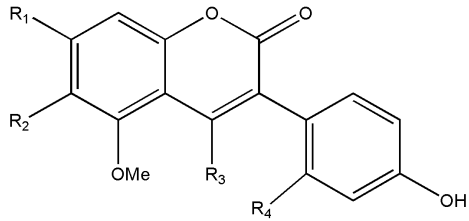
[0042] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

- [0043] 본 발명의 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0044] 상기 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물인 경우 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린 산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0045] 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0046] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0047] 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0049] 한편, 본 발명은 상기 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 발병 또는 발병 가능성이 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 치료방법을 제공한다. 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 바람직하게는 조류 인플루엔자 바이러스일 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 감염 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴일 수 있으며, 특히 조류독감일 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 용어, "개체"란 인플루엔자 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 인간 인플루엔자 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 다양한 인플루엔자 바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자 바이러스로 감염된 닭 또는 돼지를 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물을 기존의 인플루엔자 바이러스 감염 질환 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.
- [0051] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물

질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

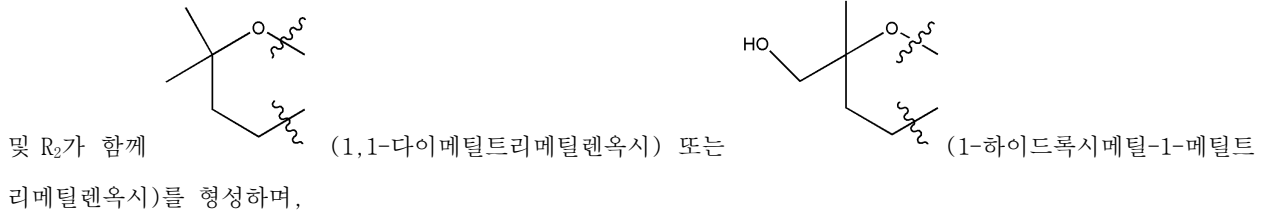
- [0052] 아울러, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0053] 즉, 본 발명의 상기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 쿠마린계 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 화합물은 원료 조성물 중 0.01 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.05 ~ 1중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.
- [0054] 상기 식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0055] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0056] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0057] 아울러, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0058] 즉, 본 발명의 화합물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 화합물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0059] 바람직하게는, 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제일 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물을 제공한다.

[0061] [화학식 1]

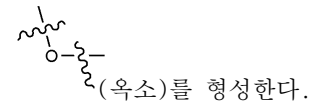


[0062]

[0063] 상기 화학식 1에서, 각각 독립적으로 R₁ 은 히드록시 또는 C₁-C₆ 알콕시이고, R₂는 C₂-C₅ 알케닐이거나, 또는 R₁



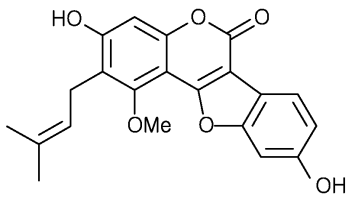
[0064] 각각 독립적으로 R₃은 수소이고, R₄는 히드록시이거나, 또는 R₃ 및 R₄가 함께



[0065] 보다 바람직하게, 상기 R₁은 메톡시이고, 상기 R₂는 3-메틸-2-부테닐이다.

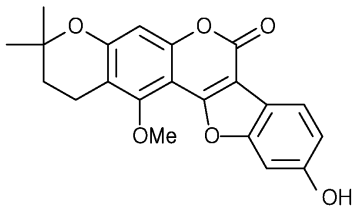
[0066] 가장 바람직하게, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2-4로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0067] [화학식 2]



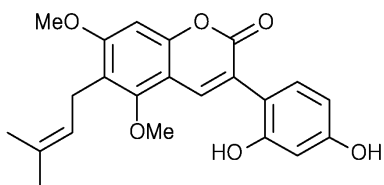
[0068]

[0069] [화학식 3]



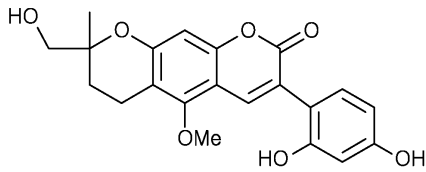
[0070]

[0071] [화학식 4]



[0072]

[0073] [화학식 5]



[0074]

[0075] 이때, 상기 뉴라미니데이즈는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스, 클로스트리디움 퍼프린젠(Clostridium perfringens), 인간에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스에서 유래한 것일 수 있다.

[0076] 뉴라미니데이즈(neuraminidase: 시알리데이즈, 아실뉴라미닐 하이드롤레이즈 라고도 알려져 있음)는 동물과 몇몇 미생물에 흔한 효소로, 뉴라미니데이즈를 함유하는 많은 미생물이 인간과 가금류, 말, 돼지, 및 바다표범을 비롯한 다른 동물에게 병을 일으킨다. 따라서, 뉴라미니데이즈 활성을 억제하는 본 발명의 조성물은 뉴라미니데이즈의 활성과 관련된 많은 질환들의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 뉴라미니데이즈를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0078] 이때, 상기 접촉은 통상적인 방법으로 이루어지고, 뉴라미니데이즈를 포함하는 시료는 살아있는 유기체, 조직 또는 세포 배양체, 생물학적 물질 시료(혈액, 혈청, 뇨, 뇌척수액, 눈물, 가래, 타액, 조직 시료 등) 등이 포함되며, 뉴라미니데이즈를 생성시키는 유기체, 대개 바이러스와 같은 병인성 유기체를 함유할 수 있다. 이러한 시료들은 물, 또는 유기 용매/물 혼합물 등을 포함하는 어떠한 배지 내에 담길 수 있다.

[0079] 또한, 본 발명의 조성물을 투여한 후에 뉴라미니데이즈의 활성은 뉴라미니데이즈 활성을 진단하는 직접 또는 간접 방법을 포함한 어떠한 방법에 의해서도 관찰될 수 있다. 뉴라미니데이즈 활성을 진단하는 정량적인, 정성적인 또는 세미-정량적인 방법들 모두가 사용가능하며, 살아있는 유기체의 생리화학적 특성을 관찰하는 등의 다른 어떠한 방법도 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0080] 본 발명에 따른 쿠마린계 화합물들을 포함하는 조성물은 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하는 효과를 나타내므로 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0082] 실시예 1: 감초 추출물의 제조

[0083] 대한민국 전라북도 정읍에서 구입한 감초 뿌리 2 kg에 100% 에탄올(EtOH) 10 l 를 가하여 실온에서 3일 방치하고 여과지로 여과하고 농축하여 감초 에탄올 추출물(134 g)을 얻었다.

[0084] 실시예 2: 감초 추출물로부터 감초 분획물 및 쿠마린계 화합물의 분리 및 정제

[0085] 상기 실시예 1에서 수득한 감초 뿌리의 에탄올 추출물로서 얻어진 갈색의 분말 590 g에 물 1ℓ를 넣어 현탁시켰다. 이를 분별 깔대기에 넣고, *n*-헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트를 순서대로 이용하여 분별 추출하여 *n*-헥산 가용추출물 (5.5 g), 클로로포름 가용추출물 (180 g), 에틸아세테이트 가용추출물 (140 g) 및 물 가용추출물을 수득하였다.

[0086] 상기에서 수득한 클로로포름 가용추출물 90 g을 100 % 클로로포름, 아세톤 및 이들의 혼합용매 (40:1 ~ 1:1)를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 500g, 70~230 메쉬(mesh))를 수행하여 10개의 분획물(Fr.-1~10)로 분리하였다. 이중 여덟 번째 분획물(Fr.-8, 12 g)은 *n*-헥산 : 에틸아세테이트(40:1 ~ 2:1 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (30 g, 230 ~ 400 메쉬)를 수행하여 그 중 Fr.-8-2 분획물(5.1 g)에 대해 이동상으로 *n*-헥산:에틸아세테이트=4:1 (v/v) 용매를 사용하여 화학식 3의 화합물 2 (20 mg)을 수득하였다.

[0087] 또한, 에틸아세테이트 가용추출물 70 g을 100 % *n*-헥산, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매 (60:1 ~ 1:4)를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 500g, 70~230 메쉬(mesh))를 수행하여 14개의 분획물(Fr.-1~14)로 분리하였다. 이중 두 번째 분획물(Fr.-2, 6 g)은 *n*-헥산 : 에틸아세테이트(50:1 ~ 2:1 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (30 g, 230 ~ 400 메쉬)를 수행하여 10개의 분획물(Fr.-3-1~10)을 얻었다. 그 중 Fr.-3-4 분획물(0.21 g)에 대해 Sephadex-LH20을 이용하여 칼럼을 실시하여 화학식 2의 화합물 1 (10 mg), 화학식 4의 화합물 3 (11 mg), 및 화학식 5의 화합물 4 (15 mg)를 수득하였다.

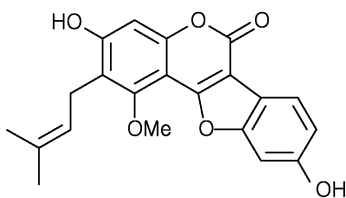
[0088] **실시예 3: 감초로부터 얻어진 쿠마린계 화합물의 구조 분석**

[0089] 상기 실시예 2에서 얻은 화합물의 분자량 및 분자식을 VG 고분해능 GC/MS 분광기(VG high resolution GC/MS spectrometer, Election Ionization MS, Autospec-Ultima)를 사용하여 결정하였다. 또한, 핵자기공명(NMR) 분석(Bruker AM 300, 500)을 통하여 ¹H NMR, ¹³C NMR의 분광학 자료를 이용하여 분자구조를 결정하였다.

[0090] 이상의 기기분석 결과를 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, 하기 화학식 2로 표시되는 글라이싸이롤, 하기 화학식 3으로 표시되는 이소글라이싸이롤, 하기 화학식 4로 표시되는 글라이싸이린, 하기 화학식 5로 표시되는 리코피라노쿠마린으로 확인하였다(Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 971). 구체적인 분석결과는 다음과 같았다.

[0091] **화합물 1: 글라이싸이롤 (Glycyrol)**

[0092] [화학식 2]

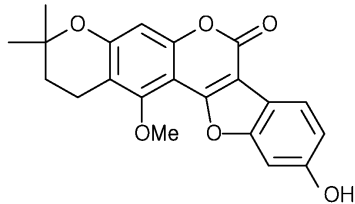


- [0093]
- [0094] 1) 물성 : 무색 결정형 (m.p. 260-262 °C)
- [0095] 2) 분자량 : 366
- [0096] 3) 분자식 : C₂₁H₁₈O₆
- [0097] 4) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.65 (3H, s, H-12), 1.76 (3H, s, H-13), 3.33 (2H, overlapped with H₂O, H-9), 3.90 (3H, s, OMe), 5.19 (1H, t, H-10), 6.77 (1H, s, H-8), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, H-5'), 7.17 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3'), 7.71 (1H, d, *J* = 8.55 Hz, H-6'). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 17.75

(C-12, q), 22.05 (C-9, t), 25.46 (C-13, q), 62.38 (C5-OMe, q), 98.51 (C-3', d), 99.20 (C-8, d), 99.71 (C-4a, s), 102.19 (C-3, s), 114.01 (C-5', d), 114.27 (C-1', s), 119.69 (C-6, s), 120.47 (C-6', d), 122.43 (C-10, d), 130.92 (C-11, s), 152.90 (C-8a, s), 153.85 (C-5, s), 156.10 (C-2', s), 156.91 (C-4', s), 157.48 (C-2, s), 158.19 (C-4, s), 159.53 (C-7, s).

[0098] **화합물 2: 이소글라이싸이롤 (isoglycyrol)**

[0099] [화학식 3]



[0100]

[0101] 1) 물성 : 무색 결정형 (m.p. 295 °C)

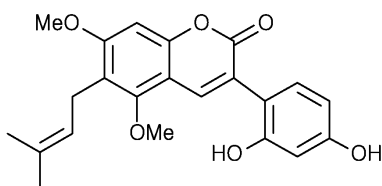
[0102] 2) 분자량 : 366

[0103] 3) 분자식 : C₂₁H₁₈O₆

[0104] 4) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.34 (6H, s, H-12, 13), 1.84 (2H, t, *J* = 13.4, 6.6 Hz, H-10), 2.80 (2H, t, *J* = 13.4, 6.8 Hz, H-9), 3.95 (OCH₃), 6.72 (1H, s, H-8), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, H-5'), 7.16 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 7.70 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6'). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.24 (C-9, t), 26.45 (C-12, 13, q), 31.04 (C-10, t), 61.51 (OCH₃), 76.03 (C-11, s), 98.52 (C-3', d), 100.43 (C-4a, s), 100.72 (C-8, d), 102.79 (C-3, s), 113.06 (C-6, s), 114.11 (C-5', d), 114.21 (C-1', s), 120.54 (C-6', d), 152.74 (C-8a, s), 153.54 (C-5, s), 156.21 (C-4', s), 157.07 (C-2', s), 157.37 (C-7, s), 157.40 (C-4, s), 157.82, (C-2, s).

[0105] **화합물 3: 글라이싸이린 (glycyrin)**

[0106] [화학식 4]



[0107]

[0108] 1) 물성 : 무색 결정형 (m.p. 197-202 °C)

[0109] 2) 분자량 : 382

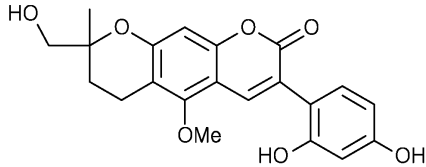
[0110] 3) 분자식 : C₂₂H₂₂O₆

[0111] 4) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.63 (3H, s, H-12), 1.73 (3H, s, H-13), 3.28 (2H, s, *J* = 7.15 Hz, H-9), 3.77 (3H, s, OMe), 3.88 (3H, s, OMe), 5.10 (1H, br t, H-10), 6.28 (1H, dd, *J* = 2.6, 8.3 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-3'), 6.88 (1H, s, H-8), 7.13 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6'), 7.85 (1H, s, H-4). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 17.67 (C-12, q), 22.26 (C-9, t), 25.43 (C-13, q), 56.40 (C7-OMe, q), 62.94 (C5-OMe, q), 95.21 (C-8, d), 102.67 (C-3', d), 106.23 (C-5', d), 107.05 (C-4a, s), 113.23 (C-1

' ,s), 119.14 (C-6, s), 121.36 (C-3, s), 122.32 (C-10, d), 131.10 (C-11, s), 131.55 (C-6' , d), 136.07 (C-4, d), 153.32 (C-8a, s), 154.55 (C-5, s), 156.05 (C-2' , s), 158.47 (C-4' , s), 159.90 (C-2, s), 160.45 (C-7, s).

[0112] **화합물 4: 리코피아라노쿠마린 (licopyranocoumarin)**

[0113] [화학식 5]



[0114]

[0115] 1) 물성 : 노란색 결정형 (m.p. 130 °C)

[0116] 2) 분자량 : 384

[0117] 3) 분자식 : C₂₁H₂₀O₇

[0118] 4) ¹H NMR (500 MHz, methanol-d₄) δ 1.31 (3H, s, H-12), 1.80 and 1.98 (2H, m, H-10), 2.82 (2H, m, H-9), 3.60 (2H each, d, J = 11.7 Hz, H-13), 3.87 (OCH₃), 6.36 (1H, dd, J = 8.3, 2.3 Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3'), 6.57 (1H, s, H-8), 7.14 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.96 (1H, s, H-4). ¹³C NMR (125 MHz, methanol-d₄) δ 17.46 (C-9, t), 21.72 (C-12, q), 28.07 (C-10, t), 62.83 (OCH₃, q), 68.77 (C-13, t), 79.44 (C-11, s), 101.17 (C-8, d), 104.12 (C-3' , d), 108.04 (C-5' , d), 108.86 (C-6, s), 113.79 (C-1' , s), 115.59 (C-3, s), 122.95 (C-4a, s), 132.90 (C-6' , d), 138.73 (C-4, d), 154.82 (C-2' , s), 156.85 (C-4' , s), 157.54 (C-5, s), 159.44 (C-7, s), 160.15 (C-8a, s), 163.61 (C-2, s).

[0119] **실험예 1: 감초 추출물 및 분획물의 뉴라미니데이즈 A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1) 저해 활성 측정**

[0120] 본 발명의 실시예 1 및 2의 감초 추출물 및 이의 분획물의 뉴라미니데이즈에 대한 저해활성을 측정하기 위하여, 1918년 스페인 독감으로부터 분리된 바이러스(A/Bervig_Mission/1/18)의 재조합 뉴라미니데이즈인 rvH1N1 인플루엔자 A 바이러스의 뉴라미니데이즈(R&D SYSTEM, 4858-NM)를 사용하였다. 기질은 2'-(4-트리메틸움벨리페릴)-α-D-N-아세틸-뉴라미닌산 나트륨염[2'-(4-trimethylumbelliferyl)-α-D-N-acetyl-neuraminic acid sodium salt]을 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

[0121] 실시예 1 및 2의 감초 추출물 및 이의 분획물을 메탄올에 녹여 각각 20 μL씩 첨가하고 기질은 2'-(4-트리메틸움벨리페릴)-α-D-N-아세틸-뉴라미닌산 나트륨염(최종농도, 200 μM)을 50 μL 넣고, 5 mM CaCl₂와 200 mM NaCl 이 첨가된 트리스 완충용액(pH 7.5) 80 μL와 혼합하였으며, 효소원인 뉴라미니데이즈(효소 최종농도, 0.05 ng/μL) 50 μL을 첨가하여 25 °C 상온에서 10분 동안 반응시키고 형광 분광기로 365 nm에서의 흡광과 445 nm에서의 발광을 측정함으로써 뉴라미니데이즈의 저해 활성을 측정하였다.

[0122] 감초 추출물 및 분획물의 뉴라미니데이즈에 대한 저해 활성 측정 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0123]	추출물 및 분획물	뉴라미니데이즈 억제활성(IC ₅₀) ¹⁾
		A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1)

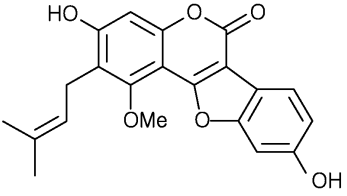
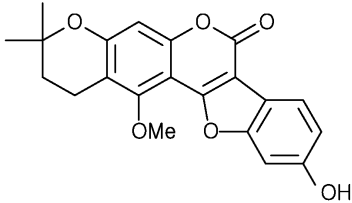
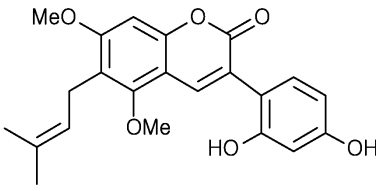
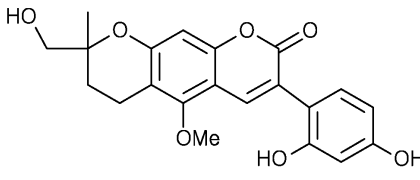
감초 알코올 추출물	150 $\mu\text{g/mL}$
감초 클로로포름 분획물	130 $\mu\text{g/mL}$
감초 에틸아세테이트 분획물	15 $\mu\text{g/mL}$
감초 물 분획물	120 $\mu\text{g/mL}$
[주] 1) : 두 번 실험의 평균값으로 결과를 나타내었다.	

[0124] 표 1에 나타난 바와 같이, 감초 추출물 및 분획물에 대하여 각각의 뉴라미니테이즈 저해 활성을 측정한 결과, 감초 알코올 추출물은 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니테이즈에 대해 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 보여주었고, 감초 클로로포름 추출물은 130 $\mu\text{g/mL}$, 감초 에틸아세테이트 분획물은 15 $\mu\text{g/mL}$, 감초 물 분획물은 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 보여 주었다. 즉, 감초 에틸아세테이트 분획물이 가장 우수한 저해효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0125] **실험예 2: 감초 추출물로부터 분리한 쿠마린계 화합물의 뉴라미니테이즈(A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1)) 저해 활성 측정**

[0126] 실시예 1 및 2의 감초 추출물에서 분리, 동정한 7종의 화합물에 대하여 실험예 1과 동일한 방법으로 뉴라미니테이즈에 대한 저해활성을 측정하였다. 본 발명의 감초로부터 분리한 쿠마린계 화합물들의 뉴라미니테이즈 저해활성 측정결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

화합물	구조	뉴라미니테이즈 억제활성(IC_{50}) ¹⁾
1		3.1 μM
2		92.4 μM
3		10% at 200 μM
4		10% at 200 μM
[주] 1) : 두 번 실험의 평균값으로 결과를 나타내었다.		

[0128] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 감초로부터 분리된 쿠마린계 화합물 1 내지 4 중 고리화가 이루어진

쿠마린계열의 쿠메스탄 화합물 1 및 2가 뉴라미니데이즈 효소에 대한 저해 활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있다.

[0129] 따라서, 본 발명의 조성물은 뉴라미니데이즈에 대한 우수한 억제효과를 나타내므로, 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 및 치료용으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0130] **실험예 3: 본 발명 화합물의 급성 독성 실험**

[0131] 본 발명의 화합물들에 대한 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0132] 6주령의 특정 병원체 부재(SPF, specific pathogens free) C57BL/6J 마우스를 암수 각각 12 마리씩 4군(암수 각각 3마리/실험군)으로 나누어, 온도 22± 3℃, 습도 55± 10%, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 실험동물용 사료(마우스 및 랫트용, (주)제일제당, 서울, 대한민국) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유 섭취시켰다.

[0133] 상기 실시예 2에서 제조한 본 발명의 화합물들을 0.5% 트윈 80(tween 80) 에 50 mg/mL 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20 g 당 0.04 mL(100 mg/kg), 0.2 mL(500 mg/kg) 및 0.4 mL(1,000 mg/kg)씩 경구 투여하였다. 시료는 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 7일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 7일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

[0134] 상기와 같은 급성 독성실험 결과, 시료를 투여한 모든 마우스에서 특기할 만한 임상증상이 나타나지 않았고 폐사된 마우스도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

[0135] 따라서, 본 발명의 화합물들은 모든 마우스에서 1,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소 치사량(LD₅₀)이 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 확인되었다.

[0136] 이하, 본 발명의 감초로부터 분리된 쿠마린계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 함유한 약학적 제제 또는 건강식품의 제조예를 설명한다.

[0137] **제조예 1: 약학적 제제의 제조**

[0138] **1-1. 산제의 제조**

[0139] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 2 g

[0140] 유당 1 g

[0141] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0142] **1-2. 정제의 제조**

[0143] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 100 mg

[0144] 옥수수 전분 100 mg

[0145] 유당 100 mg

[0146] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0147] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0148] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0149] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 100 mg

- [0150] 옥수수 전분 100 mg
- [0151] 유당 100 mg
- [0152] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0153] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0154] **1-4. 주사액제의 제조**

- [0155] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 10 $\mu\text{g/ml}$
- [0156] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지
- [0157] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml
- [0158] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 °C에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0159] **제조예 2: 건강식품의 제조**

[0160] **2-1. 조리용 양념의 제조**

- [0161] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.2 ~ 10 중량%로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0162] **2-2. 토마토 케찹 및 소스의 제조**

- [0163] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.2 ~ 1.0 중량%를 토마토 케찹 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케찹 또는 소스를 제조하였다.

[0164] **2-3. 밀가루 식품의 제조**

- [0165] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.1 ~ 5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0166] **2-4. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

- [0167] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.1 ~ 1.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0168] **2-5. 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

- [0169] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0170] **2-6. 유제품(dairy products)의 제조**

- [0171] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.1 ~ 1.0 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0172] **2-7. 선식의 제조**

[0173] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0174] 김정콩, 김정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0175] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0176] 상기에서 제조한 곡물류; 종실류; 및 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0177]	곡물류(현미 35중량%, 율무 15중량%, 보리 25중량%)	75중량%
[0178]	종실류(들깨 7중량%, 김정콩 9중량%, 김정깨 7중량%)	23중량%
[0179]	본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염	1중량%
[0180]	영지	0.5중량%
[0181]	지황	0.5중량%

[0182] **2-8. 탄산음료의 제조**

[0183] 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 1중량%, 설탕 5~10중량%, 구연산 0.05~0.3중량%, 카라멜 0.005~0.02중량%, 비타민 C 0.1~1중량%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 정제수를 전체 조성물이 100중량%가 되도록 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98 ℃에서 20~180 초간 살균한 후 냉각수와 1:4의 부피 비율로 혼합하여 음료 조성물을 제조한 다음 탄산가스를 상기 음료 조성물의 0.5~0.82부피% 정도로 주입하여 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

[0184] **2-9. 건강음료의 제조**

[0185] 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 식염(0.5중량%), 물(94중량%)과 같은 부재료와 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염(1중량%)을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

[0186] **2-10. 야채주스의 제조**

[0187] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0188] **2-11. 과일주스의 제조**

[0189] 본 발명 감초로부터 분리된 화합물 또는 이의 염 0.1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.